

## 2-3-4 培養培地の調製と洗浄

efficiency, 3-7 増殖曲線 (growth curve; 3-4 項参照) がある。しかし特別な性能をもった細胞株を使用している場合は、その特徴を表現しているかどうかを調べる。

MEMは、滅菌滅菌器として、ビタミン B群を安定にするためにコハク酸でpHを4-4.25にして滅菌するより絶対された栄養培地もあるが(2-3項の参考), 特別に滅菌されなくててもグレーミンとNaHCO<sub>3</sub>以外は滅菌可能である。細胞の培地作製以来、糖を含んだ培地の滅菌には115°C 10分の滅菌が用いられているが、121°C 10分の滅菌でもよくに支障はない。

培養基の滅菌は糖の性質を保つて、滅菌後滅菌抵抗力が低下してから実験に生じて糖を削る。滅菌水蒸気が培养に残れるを防ぐときは滅菌の容器で煮殺して糖を削る。

## b. 滤過滅菌

特別な条件がない限り、現在ではメンブランフィルターによる滅菌を行う。親水性の0.2 μmのポリカーボネートやセルロースアセテート、ナイロン製のフィルターを用いる。さまざまな型の滅菌器が市販されているので、確認する量、培養細胞の性質などにより、滅菌の性質や器具を選択する。一般に多量の培地を使用する場合は滅菌用の器具用の器具がよい。少量のものは滅菌するのに重い捨てのものを使用するのが便利である。

## 2-3-5 培地滅菌の記録

## a. 滤菌滅菌

培地を滅菌滅菌したときは、滅菌が終わった時点で、メンブランフィルターにしかやや穴がないのを確認する。滅菌器・滅菌・滅菌の少なくとも3点から操作する3mLずつ取り、10mLの無菌試験用チオグリコール液滅菌液や、ブレンハートインフュージョン培地に加えら、2瓶の培地を用意し、1組は36.5°Cで3日間、ほかの1組は20°Cで14日間滅菌する(2-13項のb参照)、いずれにせよ、少量の抜き取り検査では完全に無菌状態を證明できないので、培地の性質に当たっては、前のロットが完全になくならいうちに新しい培地をつくり、新しい培地を古い培地と並行して用いて細胞性を確かめることが必要である。また、このことは、新たにつくった培地の良・不良や成分の欠落を検定するうえにも大切である。真菌の発育はゆっくりであり、アミノ酸・ビタミンの不良も強調が出来るまでに1週間あるいはそれ以上かかるものがあるので、新しいロットを早めにつくることが望ましい。

培地を滅菌滅菌するときは、滅菌時が逆逆・滅菌時間モニターランカチャックする。滅菌は滅菌滅菌した培地に平して行う。

## b. 滤菌滅菌

本廠の説明書では、マークでロットごとに記載されているは必ずある。しかし、ロットごとに多くの差があるので、ロットが変わったときは注意をとるのを望ましい。また、滅菌時に等性物質(たとえば抗凝の充てん)が混入することがある。自分の研究室で研究して作製するときも、滅菌液のロットが変わったときは等性物質をする。本廠には研究室で純化している。性質のよくわかった細胞系を用いる、最終方法としては、1) コロニー形成率(pating

## 2-3-5 培養培地の調製と洗浄

efficiency, 3-7 増殖曲線 (growth curve; 3-4 項参照) がある。しかし特別な性能をもった細胞株を使用している場合は、その特徴を表現しているかどうかを調べる。

## 2-3-6 培養培地の調製と洗浄

a. 0.2% フェノーフレット (phenol red) (滅菌) 1.0 mLを0.1M NaOH 40 mLに溶かし、滅菌水を加えて500mLとする。滅菌して60°Cに保育するときには2 mLの

クロロホルムを加える、これを滅菌して2-10mL加える。最終濃度0.05% でよい。

b. 7.5% NaHCO<sub>3</sub>、滅菌NaHCO<sub>3</sub> (2-3項のa参照) 1. 滅菌滅菌水に溶かして全量100mLとし、滅菌水で100mLとし、滅菌滅菌して、ロをききつめて保育する。

c. トリアルミン液  
トリアルミン 1:250 (Difco) 2.5 gをCMF-PBS (2-3項のa参照) に溶かしてpHを8.0にし、4°Cで1週間保存する。NaOHを加えてpHを8.0にし、4°Cで1週間保存すると解けやすい。滅菌滅菌前に、HClでpHを7.2に調整する。しかし、pHを調整しながらも使用に耐える。メンブランフィルターで滅菌滅菌する前に、滅菌を普通の紙を通過した滅菌か、1000 rpm 10 分離心した上清を通過滅菌する。目的に応じて、0.05-0.25% の範囲で使用する。

2. 指示液より滅菌品として結果トリアルミン (トリアルミン) が滅菌した滅菌滅菌として販売されているので、CMF-PBSに溶解する。そのまま使用することができる。アンプル100000 Uと1-100000 Uの製品がある。滅菌液には200-800 U/ml、初代培養では800-1000 U/mlとし、滅菌あるいはEDTAを加えて使用する。滅菌では急速に失活するので、滅菌後保存する場合は必ず原液保存する。

d. 2% 中性EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) 滅菌  
EDTA-2 NaまたはVersene (EDTA-4 Na) 2 gを滅菌水に溶かし、HClを用いてpH7.4にし、滅菌水で100mLとする。滅菌滅菌する。CMF-PBSまたは0.05-0.1% トリアルミン滅菌に1/100 稀釀え。0.02% EDTAの濃度で使用する。

e. ディスパーザ液  
滅菌中性アロテアーゼ (ディスパーザ、合同会社: 貴科精工7参考) は、中性・非酸性アミノ酸のアミノ酸のペプチド鎖を切断する金属酵素である。血清やカゼイシウムを含む培養液中でも活性があるため、細胞をいために分散することができる。初代培養のための細胞分散液、混合した細胞混合から均一化の

## REFERENCE DOCUMENT

**Reference document 1:**

Title: Introduction to Cell Engineering

Published by: CORONA PUBLISHING CO.,LTD., in 1994

Authors: Hiroki Murakami, Takuya Sugawara

(Partially excerpted from page 68)

**3.3.3 Preparation of trypsin solution**

When collecting adhesive cells for subculturing or experiments, trypsin is generally used to detach such adhesive cells. We dissolve in 0.02% EDTA-PBS a product called Trypsillin which is a lyophilized product of a trypsin derived from bovine pancreas and produced by Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. The 0.02% EDTA-PBS is prepared using EDTA-2Na and PBS (-) including neither  $Mg^{2+}$  nor  $Ca^{2+}$ , and is autoclaved before use.

Since the Trypsillin is a sterilized product, there is no need to filtrate the same for sterilization when dissolved in the 0.02% EDTA-PBS which has been sterilized. Such Trypsillin contains 10,000 units of trypsin in a vial, and is dissolved in the 0.02% EDTA-PBS of 50 mL, thus preparing a solution of 200 units/mL. The solution thus obtained remains usable for a month when preserved at 4°C, and will be newly prepared when the potency thereof has decreased.

**Reference document 2:**

Title: Tissue Culture Technique (Basics)

Published by: Asakura Publishing Co., Ltd., in 1999

Authors: The Japanese Tissue Culture Association

(Partially excerpted from page 23)

**c. Trypsin Solution**

Trypsin 1:250 (Difco) of 2.5g is dissolved in CMF-PBS (see b in section 2-3-2) so as to obtain a solution of 1L. Since trypsin is not easily dissolved, the solution thus obtained is stirred overnight at 4°C. Particularly, trypsin is easily dissolved, if NaOH is added to the aforementioned solution to adjust the pH thereof to 8.0 before stirring such solution overnight at 4°C. The pH of a solution thus obtained is adjusted to 7.2 with HCl before filtration. However, the solution thus obtained is still usable even if the pH thereof is not adjusted. Before filtrating for sterilization with a membrane filter, filtration sterilization is performed on either a filtrate obtained by filtrating the solution prepared so far with a general filter paper, or a supernatant obtained by centrifugally separating the solution prepared so far for 10 minutes and at a speed of 10,000rpm. A trypsin solution prepared in this manner is used in the range of 0.05-0.25% in accordance with the intended use.

A crystallized trypsin (Trypsillin) is available from Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. as a pharmaceutical product, such crystallized trypsin being provided particularly as a sterilized lyophilized product. In this sense, such crystallized trypsin can be readily used when dissolved in CMP-PBS. There are provided a Trypsillin of 10,000U contained in an ampule, and a Trypsillin of 100,000U contained in a vial. A trypsin solution of 200-800U/mL is used for subculturing, while a trypsin solution of 800-1000U/mL is used for primary culturing. Such trypsin solution can be used alone or with EDTA added thereto. The trypsin solution is rapidly deactivated at room temperature. Thus, the trypsin solution must be frozen for preservation when desiring to preserve the same after the Trypsillin has been dissolved.

End of Draft